



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 41 749 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁷:
A 61 K 31/7028

⑳ Aktenzeichen: 101 41 749.7
㉔ Anmeldetag: 29. 8. 2001
㉓ Offenlegungstag: 14. 3. 2002

DE 101 41 749 A 1

⑥6 Innere Priorität:
100 42 457. 0 29. 08. 2000

⑦1 Anmelder:
Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

⑦4 Vertreter:
Baumbach, F., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
13125 Berlin

⑦2 Erfinder:
Bader, Michael, Dr., 13125 Berlin, DE; Pesquero,
Joao Bosco, Dr., Sao Paulo, BR; Madeddu, Paolo,
Sassari, IT; Emanuelli, Costanza, Sassari, IT

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Mittel zur Beeinflussung der Angiogenese

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Beeinflussung der Angiogenese, also der Neubildung von Blutgefäßen. Anwendungsgebiete dieses Mittels sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Die Erfindung hat das Ziel, neue Mittel zur Beeinflussung der Angiogenese aufzufinden. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, entsprechende medizinisch einsetzbare Substanzen zur Herstellung dieser Mittel bereitzustellen.

Das erfinderische Mittel ist dadurch gekennzeichnet, daß es die Angiogenese beeinflusst, das heißt diese fördert oder hemmt. Die Förderung der Angiogenese wird beispielsweise durch Erhöhung der Synthese des B1-Rezeptors (Transkriptionsverstärkung, z. B. durch Cytokine) oder durch Verstärkung seiner Aktivität (Agonistische Substanzen) erreicht. Hemmung der Angiogenese wird beispielsweise durch Antagonisten des Kinin B1-Rezeptors, wie des Arg⁹-Leu⁸-Bradykinin (DALBK) oder nicht-peptidische Substanzen, sowie durch Hemmung der Synthese des Proteins, z. B. mit Glukukortikoiden, erreicht.

DE 101 41 749 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Beeinflussung der Angiogenese, also der Neubildung von Blutgefäßen. Anwendungsgebiete dieses Mittels sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

[0002] Angiogenese ist ein Vorgang, der in Geweben mit ungenügender Sauerstoffversorgung (Ischämie) induziert wird. Bei ischämischen Erkrankungen, wie dem Herzinfarkt, ist Angiogenese für eine Heilung unabdingbar. Angiogenese ist aber auch entscheidend für das Wachstum von Tumoren, da diese ohne ausreichende Blutversorgung nicht wachsen können. Darüber hinaus spielt eine zu starke Gefäßneubildung auch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Augenerkrankungen, wie der Makuladegeneration und der diabetischen Retinopathie.

[0003] Kinine entstehen durch die enzymatische Wirkung von Kallikreinen auf deren Substrate die Kininogene, wobei zunächst Agonisten, wie Bradykinin, Kallidin und T-Kinine, nur für den einen der beiden Kininrezeptoren, den B2-Rezeptor gebildet werden. Nach einem weiteren enzymatischen Abbau der C-terminalen Aminosäure durch Kininase I (Carboxypeptidase) entstehen Agonisten für den zweiten Rezeptor, B1, wie des-Arg⁹-Bradykinin und des-Arg¹⁰-Kallidin.

[0004] Da die Synthese des B1 Rezeptors nur in entzündetem oder ischämischem Gewebe durch Cytokine induziert wird (Abb. 1), werden die Hauptwirkungen der Kinine in Normalgewebe über den B2-Rezeptor und in Entzündungsregionen über den B1-Rezeptor vermittelt und betreffen, neben der Blutdruckregulation, die Steuerung lokaler Entzündungsprozesse (Übersicht in Regoli & Barabé, Pharmacol Rev. 1980; 32: 1-46; Marceau et al., Pharmacol Rev. 1998; 50: 357-386).

[0005] Aufgrund der hohen Konzentration und der ubiquitären Verteilung von Kininasen, wie dem Angiotensin-Konversionsenzym und der Neutralen Endopeptidase, ist die Wirkung von gebildeten Kininen im Organismus nur von kurzer Dauer. Die Halbwertszeit von Bradykinin im Plasma liegt unter 30 sek, so daß man davon ausgehen kann, daß im Plasma generierte Kinine nicht von großer physiologischer Bedeutung sind, daß also stattdessen lokal im Gewebe produzierte Peptide die entscheidenden Mediatoren darstellen. Da Bradykinin auch sehr schnell in des-Arg⁹-Bradykinin umgebaut wird, können beide Kinin-Rezeptoren in dessen physiologische Wirkungen involviert sein. Erst seit wenigen Jahren ist es durch die Entwicklung spezifischer Antagonisten und die selektive Ausschaltung der beiden Rezeptoren in Mäusen durch Knockout-Technologie (Borkowski et al., J. Biol. Chem. 1995; 270: 13706-137710; Pesquero et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97: 8140-8145) möglich geworden, den für eine bestimmte Kininwirkung verantwortlichen Rezeptorsubtyp und damit auch den jeweiligen Agonisten zu ermitteln.

[0006] Die Erfindung hat das Ziel, neue Mittel zur Beeinflussung der Angiogenese aufzufinden. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, entsprechende medizinisch einsetzbare Substanzen zur Herstellung dieser Mittel bereitzustellen.

[0007] Diese Aufgabe wird mit den in den Ansprüchen dargestellten Maßnahmen gelöst.

[0008] Ausschlaggebend für die Erfindung ist die überraschende Entdeckung, daß der Kinin B1 Rezeptor die Angiogenese beeinflusst. Aus dieser Entdeckung leitet sich die Möglichkeit ab, Substanzen bereitzustellen, die auf die Angiogenese entweder antagonistisch, also hemmend, oder agonistisch – fördernd – wirken. Die Förderung der Angiogenese wird erfindungsgemäß durch Erhöhung der Synthese (Transkriptionsverstärkung, z. B. durch Cytokine) oder der

Aktivität des B1-Rezeptors (Agonistische Substanzen) erreicht. Damit können ischämische Erkrankungen an den Extremitäten sowie Herzinfarkte erfolgreicher behandelt werden. Die Hemmung der Angiogenese ist von Bedeutung bei der Tumorthherapie und bei bestimmten Augenerkrankungen. Sie wird erfindungsgemäß durch Antagonisten des Kinin B1-Rezeptors, wie des-Arg⁹-Leu⁸-Bradykinin (DALBK) oder nicht-peptidische Substanzen, sowie durch Hemmung der Synthese des Proteins, z. B. mit Glukukortikoiden, erreicht.

[0009] Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden:

1. Expression des Kinin B1 Rezeptors in ischämischem Gewebe (Abb. 1).
2. Knockout-Mäuse (B1KO), denen der Kinin B1-Rezeptor fehlt, zeigen im Gegensatz zu Kontrollmäusen (J129) praktisch keine Reperfusion (Abb. 2) und keine Kapillarneubildung (Abb. 3) in operativ ischämisch gemachten Hinterbeinmuskeln.
3. Auslösung des unter 2 beschriebenen Effektes durch die chronische Behandlung von Mäusen mit B1-Antagonisten (Abb. 4 und 5).

Legenden

Abb. 1

- 30 Der Bradykinin B1-Rezeptor (B1) ist im ischämischen Adduktormuskel 1, 2 und 3 Tage (d) nach Induktion der Ischämie induziert. Die Höhe der mRNA-Expression im normaldurchbluteten kontralateralen Muskel (C) ist als Referenz dargestellt.
- 35 (Die unilaterale Ischämie des Hinterbeins wurde durch Entfernen der linken Femoralarterie induziert.)

Abb. 2

- 40 Die Wiederherstellung der post-ischämischen Perfusion ist in B1-Knockout-Mäusen (B1KO) im Vergleich zu ihren Wildtypkontrollen – J129 Mäusen – stark beeinträchtigt. Die Wiederherstellung des Blutflusses ist als Unterschied im Fluß zwischen den ischämischen Beinen und den kontralateralen Beinen dargestellt. Der Blutfluß wurde über Doppler-Flußmessung (Lisca Color Doppler) gemessen. Die Versuche wurden 14 Tage nach der Induktion der Ischämie aus ethischen Gründen beendet. Tatsächlich hatten zu diesem Zeitpunkt 14 der 15 B1-KO-Mäuse eine spontane Amputation ihrer ischämischen Beine.
- 50

Abb. 3

- 55 B1KO-Mäuse zeigen keine spontane angiogenetische Reaktion auf die Induktion der Ischämie des Hinterbeins. Diese natürliche Reaktion ist bei den J129 Wildtypkontrollen vorhanden.
- [0010] Die Kapillarendichte wird entweder als Anzahl der Kapillaren pro mm² Adduktormuskel (Abb. 3A) oder als Anzahl der Kapillaren pro Myofibrille im Adduktor angegeben (Abb. 3B).
- 60

Abb. 4

- 65 Die Wiederherstellung der post-ischämischen Perfusion ist in Swiss-Mäusen, die chronisch mit einem B1-Antagonisten (DALBK, n = 5 Mäuse) behandelt wurden, im Vergleich zu Mäusen, denen ein Placebo verabreicht wurde (n = 6), be-

einträchtigt.

Abb. 5

Die spontane angiogenetische Reaktion auf Ischämie des Hinterbeins wird durch B1-Rezeptor Antagonismus (DALBK) in Swiss-Mäusen vermindert.

Patentansprüche

1. Mittel zur Beeinflussung der Angiogenese, **dadurch gekennzeichnet**, daß es den Kinin B1-Rezeptor beeinflusst. 10
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Synthese des Kinin B1-Rezeptors und damit die Angiogenese hemmt. 15
3. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es Glukokortikoide enthält.
4. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es lokal appliziert wird. 20
5. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es bei der Behandlung solider Tumore eingesetzt wird.
6. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es bei der Behandlung von Erkrankungen mit pathologisch verstärkter Gefäßneubildung eingesetzt wird. 25
7. Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es bei der Behandlung von Augenerkrankungen mit verstärkter Gefäßneubildung, wie Makuladegeneration und Diabetischer Retinopathie eingesetzt wird. 30
8. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aktivität des Kinin B1-Rezeptors und damit die Angiogenese hemmt.
9. Mittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es Antagonisten, wie Des-Arg⁹-Leu⁸-Bradykinin (DALBK), enthält. 35
10. Mittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es lokal appliziert wird.
11. Mittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es bei der Behandlung solider Tumore eingesetzt wird. 40
12. Mittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es bei der Behandlung von Erkrankungen mit pathologisch verstärkter Gefäßneubildung eingesetzt wird. 45
13. Mittel nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es bei der Behandlung von Augenerkrankungen mit verstärkter Gefäßneubildung, wie Makuladegeneration und Diabetischer Retinopathie eingesetzt wird. 50
14. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Bildung der natürlichen Agonisten des Kinin B1-Rezeptors, wie des-Arg⁹-Bradykinin, und des-Arg⁹-Kallidin und dadurch die Angiogenese hemmt.
15. Mittel nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Hemmstoff für Kallikreine (Aprotinin) oder Carboxypeptidasen (MERGETPA) enthält. 55
16. Mittel nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es lokal appliziert wird.
17. Mittel nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es bei der Behandlung solider Tumore eingesetzt wird. 60
18. Mittel nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es bei der Behandlung von Erkrankungen mit pathologisch verstärkter Gefäßneubildung eingesetzt wird. 65
19. Mittel nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es bei der Behandlung von Augenerkrankungen

mit verstärkter Gefäßneubildung, wie Makuladegeneration und Diabetischer Retinopathie eingesetzt wird.

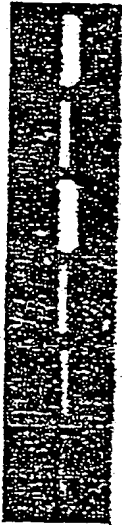
20. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Synthese des Kinin B1-Rezeptors und damit die Angiogenese stimuliert.
21. Mittel nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß es Cytokine, wie Interleukin1 β , enthält.
22. Mittel nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß es lokal appliziert wird.
23. Mittel nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß es bei ischämischen Erkrankungen eingesetzt wird.
24. Mittel nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß es bei ischämischen Erkrankungen des Herzen, wie Herzinfarkt, eingesetzt wird.
25. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aktivität des Kinin B1-Rezeptors und damit die Angiogenese stimuliert.
26. Mittel nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß es Agonisten für den Kinin B1-Rezeptor, wie des-Arg⁹-Bradykinin, und des-Arg⁹-Kallidin, enthält.
27. Mittel nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß es die natürlichen Agonisten des Kinin B1 Rezeptors, wie des-Arg⁹-Bradykinin, und des-Arg⁹-Kallidin stabilisiert.
28. Mittel nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Kininaseinhibitor, wie einen Angiotensin-Konversionsenzymhemmer (wie Captopril), einen Hemmstoff für die Neutrale Endopeptidase (wie Thiorphan) oder ein Präparat mit Kombinationswirkung (wie Omapatrilat), enthält.
29. Mittel nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß es lokal appliziert wird.
30. Mittel nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß es bei ischämischen Erkrankungen eingesetzt wird.
31. Mittel nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß es bei ischämischen Erkrankungen des Herzen, wie Herzinfarkt, eingesetzt wird.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

C = Contralateral
Adductor Muscle
I = Ischemic
Adductor Muscle

1d	2d	3d
C I	C I	C I



B1

B2

tK

GAPDH

Abb. 1

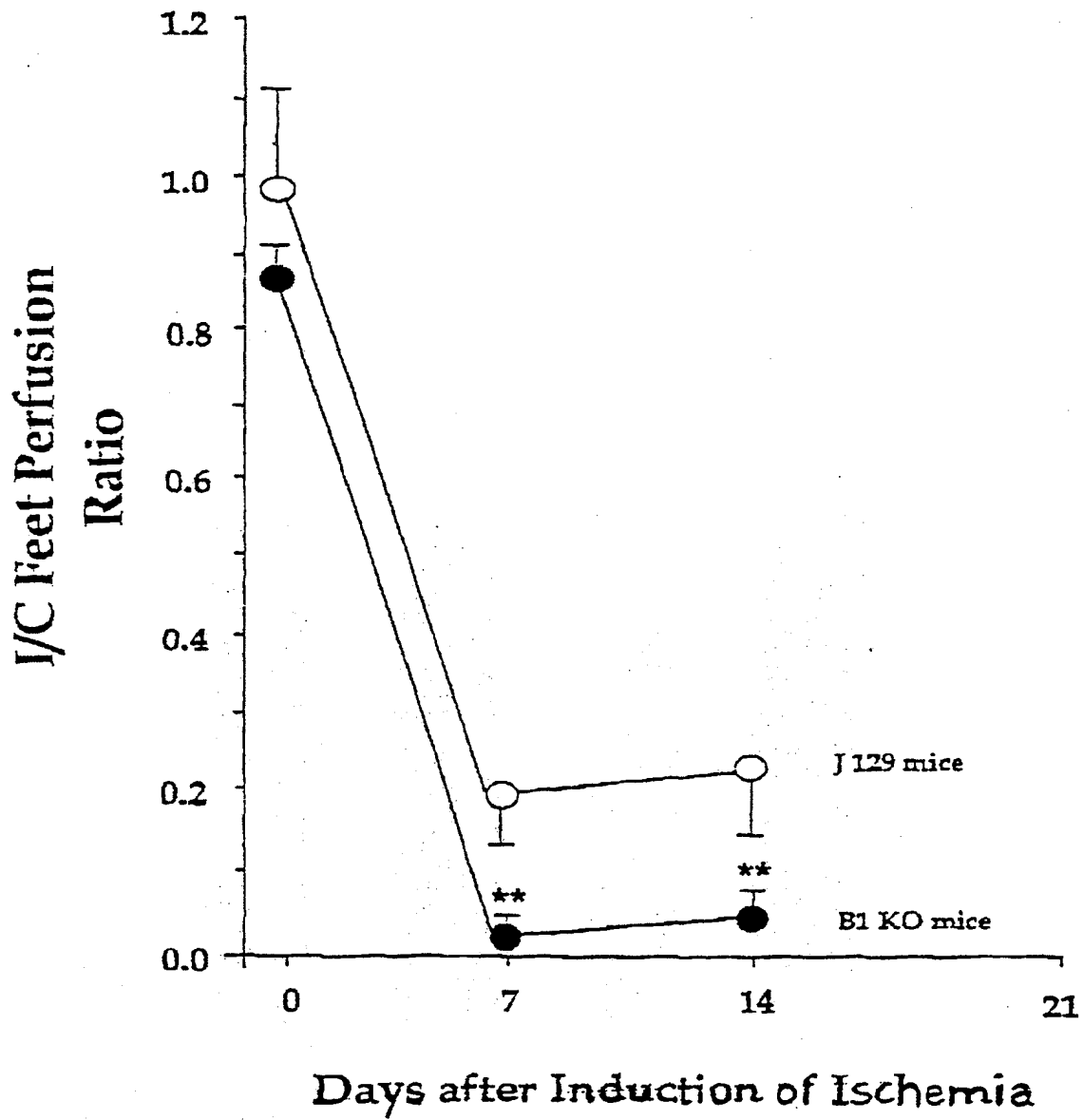


Abb. 2

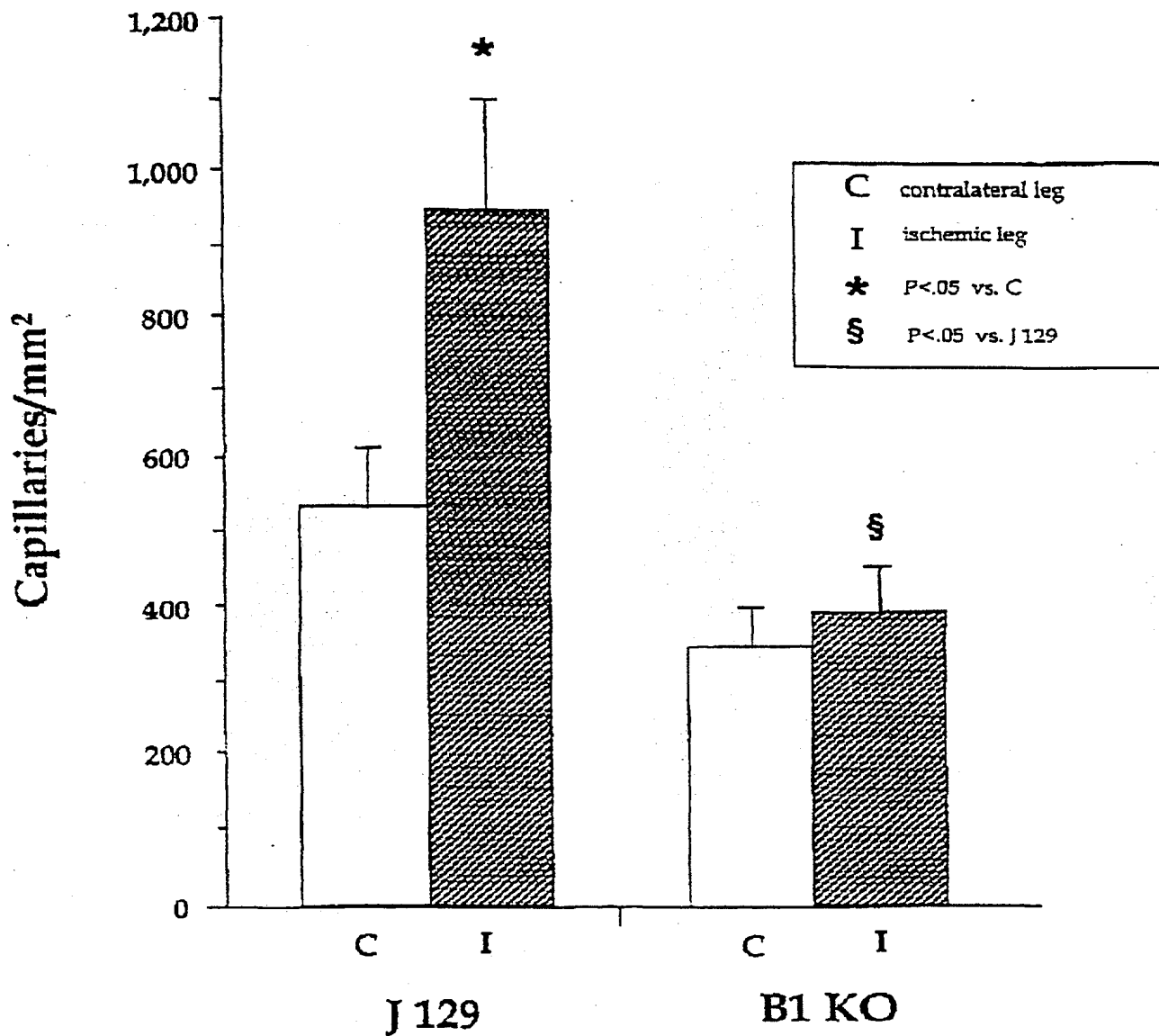


Abb. 3 A

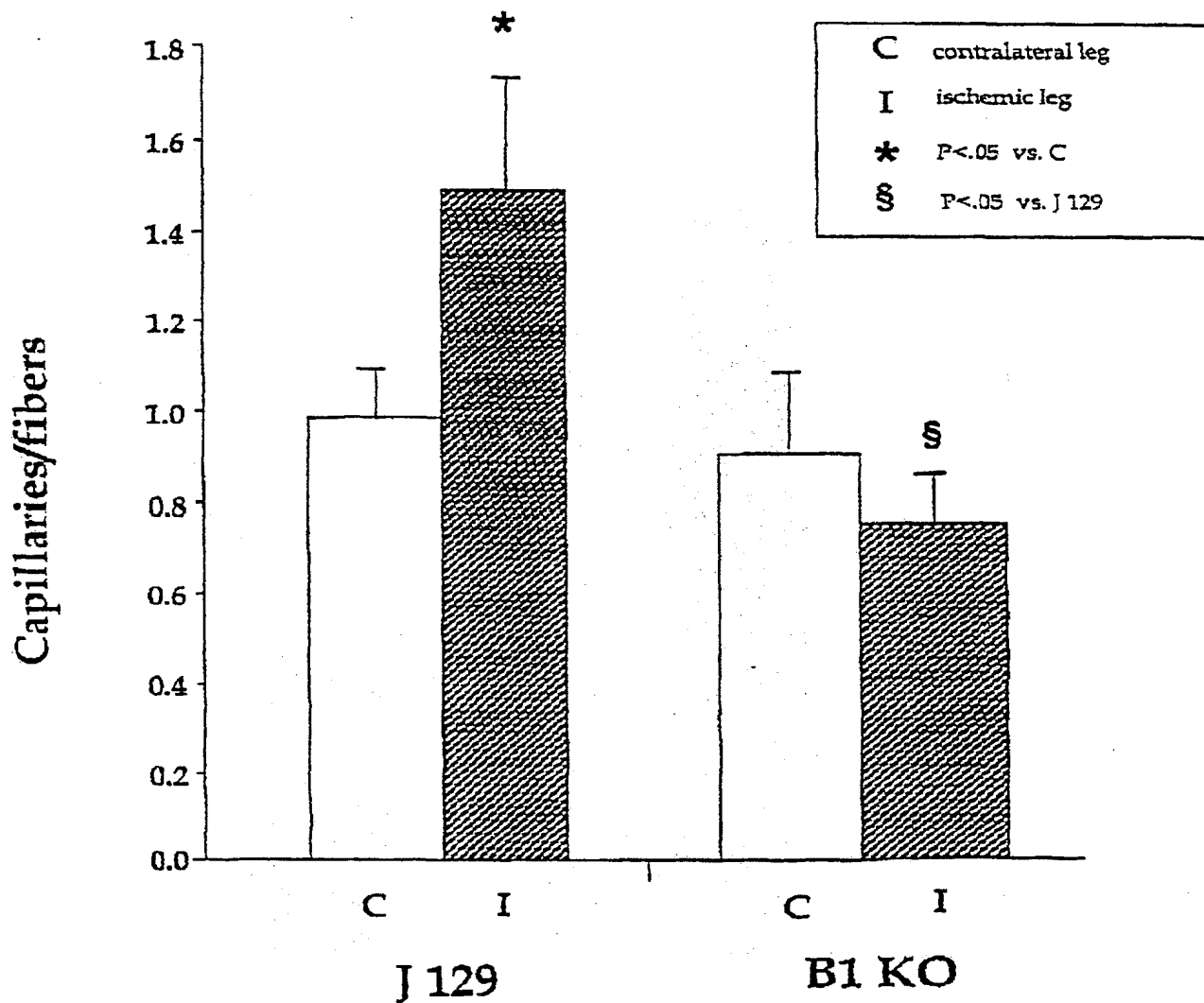


Abb. 3 B

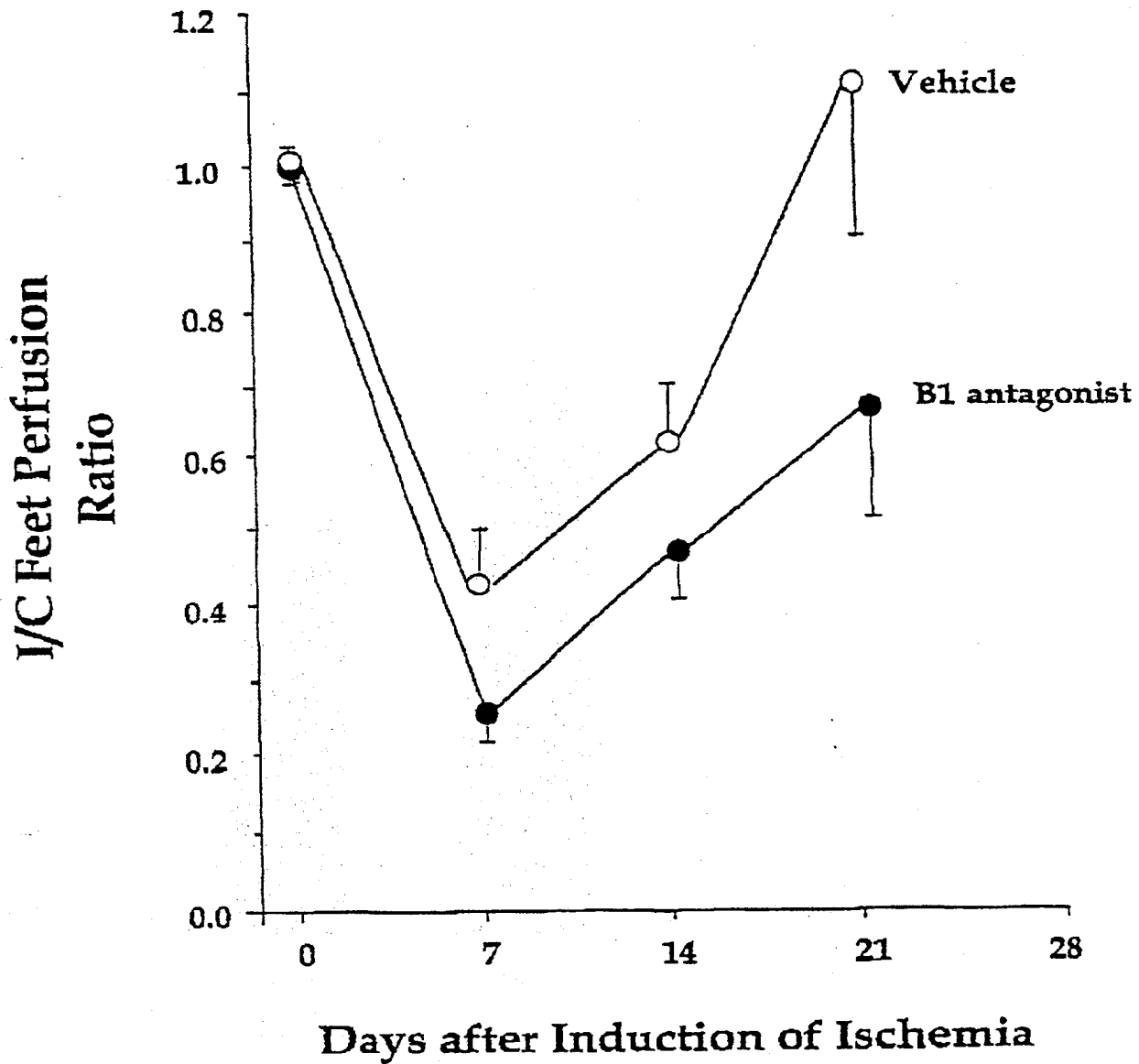


Abb. 4

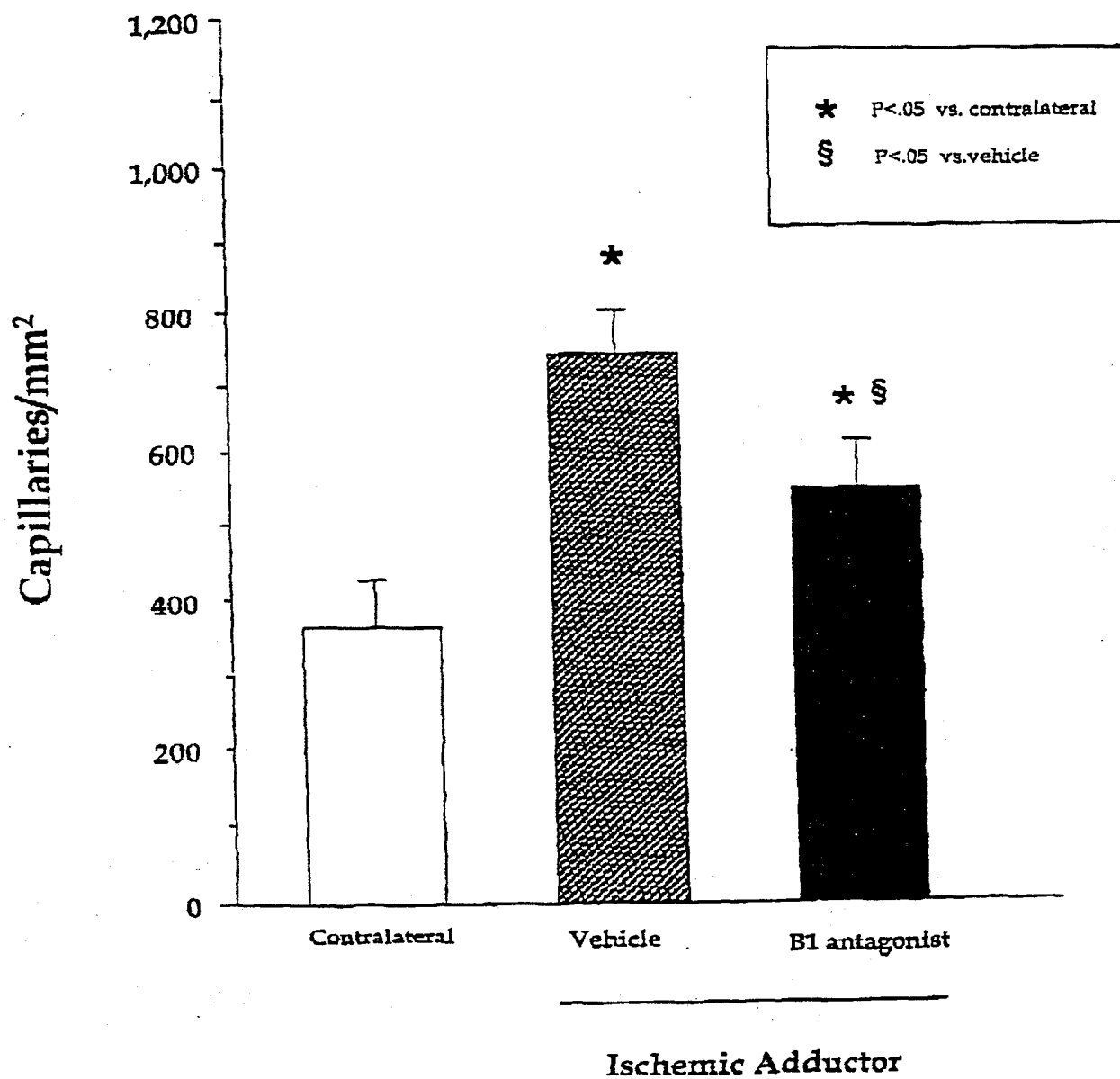


Abb. 5